



РСТ/ЕР 00/02308

#3



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(РОСПАТЕНТ)

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

рег. No 20/12-215

"27" марта 2000 г.

СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности Российского агентства по патентам и товарным знакам настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы и чертежей (если имеются) заявки на выдачу патента на изобретение N 99106754, поданной в марте месяце 25 дня 1999 года (25.03.99).

Название изобретенияСпособ получения полипептидов
в бесклеточной системе**Заявитель**Институт белка Российской ака-
демии наук**Действительный автор(ы)**БИРЮКОВ Сергей Владимирович
СИМОНЕНКО Петр Николаевич
ШИРОКОВ Владимир Анатольевич
СПИРИН Александр Сергеевич**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)Уполномоченный заверить копию
заявки на изобретениеГ.Ф. Востриков
Заведующий отделом

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ

Int. Cl.

C12P 21/00

ПОЛИПЕПТИДОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ

Область техники

Изобретение относится к области молекулярной биологии, в частности, к синтезу белков и полипептидов в бесклеточных системах, получаемых из прокариотических и эукариотических клеток.

Уровень техники

Синтез полипептидов и белков в бесклеточных системах трансляции первого поколения (US Patent 4668624, Roberts, 1979) проводился в статическом (batch) режиме, в котором реакционная смесь находится в условиях постоянства параметров концентраций Mg^{2+} , K^{+} и температуры. Для работы этих систем используют экстракты из прокариотических (Zubay, 1973) и эукариотических клеток (Roberts and Paterson, 1973; Pelham and Jackson, 1976), а также природные или синтетические mRNA (US Patent 4937190, Palmenberg, 1990).

Быстрое развитие биотехнологии потребовало разработки альтернативных методов, позволяющих повысить выход синтезируемых белков. Одно из направлений в совершенствовании методов было связано с разработкой более эффективных систем трансляции, в которых концентрацию основных компонентов бесклеточной системы поддерживают в процессе синтеза на постоянном уровне. В этих системах второго поколения (Spirin et al., 1988) непрерывный ввод субстратов (режим CFCF) питающей смеси и вывод низкомолекулярных продуктов, ингибирующих работу бесклеточной системы, повышает время работы и выход целевого белка по сравнению с классической системой синтеза в статических (batch) условиях. Известны работы, которые были направлены на оптимизацию условий синтеза белков в CFCF режиме (Baranov, 1989; Ryabova et al., 1989; Takanori et al., 1991; Spirin, 1992; Baranov and Spirin, 1993; Volyanik et al., 1993; Erdman et al., 1994; Kim

and Choi , 1996; Yamamoto , 1996; Ryabova et al., 1998; EP Patent 0312617, Alakhov et al., 1993; EP Patent 0401369, Baranov et al., 1995; US Patent 5478730, Alakhov et al., 1995; EP Patent 0485608, Ovodov et al., 1995; US Patent 5434079, Mozayeni , 1995; JP Patent 7075592, Shimizu , 1995; JP Patent 7031494, Sakurai , 1995; JP Patent 5076381, Sato , 1995; EP Patent 0593757, Baranov et al., 1997; US Patent 5593856, Choi et al., 1997).

Другой способ увеличения эффективности синтеза основан на использовании принципа непрерывного обмена (CECF режим) компонентов питающей смеси с компонентами реакционной смеси через полупроницаемый барьер за счет диффузионного процесса (US Patent 5478730, Alakhov et al., 1995). Результаты, полученные рядом авторов (Davis et al., 1996; Kim and Choi , 1996; US Patent 5593856, Choi , 1997; JP Patent 10080295, Yamane , 1998), демонстрируют значительное увеличение выхода синтезируемого целевого полипептида за счет процесса непрерывного обмена по сравнению со статическим (batch) режимом работы.

Одновременно с совершенствованием систем трансляции продолжались работы по совершенствованию способов получения mRNA в транскрипционных системах, включающих RNA полимеразу и DNA. В этих системах получение mRNA зависит от концентрации RNA полимеразы и DNA, а также от концентрации Mg^{2+} , pH, NTP и от других ионных условий (Kern and Davis , 1997). Стоимость компонентов для in vitro транскрипции, включающих RNA полимеразу , DNA и NTP достаточно велика . Поэтому необходимо проводить анализ условий транскрипции и оптимизировать процесс получения mRNA (Gureyich et al., 1991).

Известны способы синтеза полипептидов в режиме CFCF в прокариотических бесклеточных системах в условиях сопряженной транскрипции-трансляции (Baranov et al, 1989; EP Patent 0401369, Baranov et al., 1995; Ryabova et al., 1998) и способы синтеза в эукариотических бесклеточных системах, в которых этапы транскрипции и

трансляции происходят в одном реакционном объеме (Spirin , 1992; Baranov and Spirin , 1993; EP Patent 0593757, Baranov et al., 1997).

Для эукариотических бесклеточных систем известно (Craig et al., 1993), что условия транскрипции и трансляции различны и, в сильной степени, определяются величиной концентрации Mg^{2+} и K^{+} . Учитывая эти особенности широко используется двух - (US Patent 5665563, Beckler, 1997; Operating Guide, Single Tube Protein™, Novagen Inc., 1998) или трех - шаговая процедура синтеза (Roberts, 1973) в статических (batch) условиях. На первом шаге создаются оптимальные условия для транскрипции, после чего полученную mRNA или очищают или сразу добавляют в новую реакционную смесь с подобранными условиями для трансляции. Известны одношаговые процедуры синтеза полипептидов в системе транскрипции-трансляции (US Patent 5324637, Thompson et al. ,1994; Operation Guide, Linked in vitro SP6/T7 Transcription/Translation Kit, Roche Diagnostics GmbH, 1998). Авторы патента (US Patent 5324637, Thompson et al. ,1994) используют известный принцип оптимизации концентрации Mg^{2+} в реакционной смеси. Добавляя соль Mg^{2+} в реакционную смесь перед началом синтеза, они устанавливают в реакционной системе концентрацию Mg^{2+} , имеющую промежуточное значение между двумя оптимальными концентрациями Mg^{2+} для транскрипции и для трансляции. Дальнейшие исследования показали, что такого рода оптимизация не дает значительного преимущества перед двух - шаговыми или трех - шаговыми процедурами. Известны исследования (Laios et al., 1998), которые говорят о том, что оптимизация каждого из этапов, а именно транскрипции и трансляции, в 2 - 6 раз более эффективна, чем оптимизация сопряженного процесса. С другой стороны, процесс оптимизации выбора значения концентрации соли Mg^{2+} основан на предварительной процедуре измерения концентрации солей Mg^{2+} в лизате или реакционном объеме, что обесценивает принцип одношаговой процедуры.

В патенте EP 0593 757 (Baranov et al., 1997) показана возможность проведения непрерывного (CFCF) синтеза полипептидов в эукариотических бесклеточных системах транскрипции-трансляции в течении 20 часов. В течение синтеза величина концентрации Mg^{2+} поддерживается на необходимом уровне за счет постоянства концентрации Mg^{2+} в питающей смеси. Поскольку рибонуклеазная активность в реакционной системе мала и матрицы mRNA сохраняют свою активность в течении длительного времени, реакционная смесь работает с ранее и вновь синтезированными матрицами mRNA и синтезирует целевой продукт при постоянной концентрации Mg^{2+} . Для того, чтобы синтез прошел более успешно, необходимо чтобы транскрипционная составляющая системы транскрипции-трансляции производила синтез достаточного количества mRNA и для этих целей использовалось большое количество дорогостоящей полимеразы SP6 или T7 (до 30000 единиц). В тексте патента указано, что оптимальные условия синтеза должны быть подобраны в каждом конкретном случае. Для такого подбора необходимо провести несколько синтезов в статическом (batch) режиме при разных значениях концентраций Mg^{2+} и определить оптимальное значение Mg^{2+} для данного полипептида. Оптимизация процесса требует времени и является достаточно дорогостоящей процедурой.

Известны устройства, в которых режим непрерывного обмена (CECF) поддерживается за счет процесса диффузии. Устройство на основе диализного мешка, для синтеза полипептидов в бесклеточной системе, впервые описано в патенте US 5478730 (Alakhov et al., 1995). Фирма Promega Corp. (Davis et al., 1996) привела сравнительный анализ синтезов, в статическом (batch) режиме и в режиме непрерывного обмена, для сопряженной транскрипции-трансляции в прокариотической системе на основе экстракта из *E. coli*. Авторы использовали для сравнения диализаторы, выпускаемые фирмой Spectrum Medical Industr. типа

"DispoDialyser" (US Patent 5324428, Flaherty, 1994) и диализаторы "Slidealyzer", выпускаемые фирмой Pierce Chemical Comp. (US Patent 5503741, Clark, 1996).

Для синтеза полипептидов в режиме сопряженной транскрипции-трансляции в предварительно концентрированной прокариотической системе (Kim and Choi, 1996) использована диализная мембрана, укрепленная на дне цилиндра.

Известен диализатор, в котором мембрана выполнена из полых волокон (Yamamoto, 1996). Питающая смесь проходит по внутреннему объему полых волокон, за счет диффузии происходит обмен между компонентами реакционной смеси и питающей смесью.

Известно устройство (JP Patent 10080295, Yamane, 1998), в котором мембрану используют для поддержания постоянных условий синтеза за счет диффузии низкомолекулярных субстратов питающей смеси, циркулирующей вдоль диализной мембраны.

Наиболее близким к рассматриваемым в данном изобретении устройствам, работающим в режиме непрерывного обмена CECF, является патент US Patent 5478730 (Alakhov et al., 1995). Авторы патента привели детальное описание требований к пористому барьеру, который может быть выполнен из диализной мембраны, плоских мембран или полых волокон и которые, в свою очередь, могут быть скомпонованы в многослойные структуры.

Известны устройства, которые реализуют проточный (CFCF) принцип работы. Эти устройства отличаются друг от друга принципами формирования потоков питающей среды и принципами отвода продуктов синтеза и метаболизма ингибирующих работу системы.

Использование одной ультрафильтрационной мембраны в реакторе проточного типа описано в ряде статей (Spirin et al., 1988; Takanori et al., 1991; Spirin, 1992; Volyanik et al., 1993; Kim and Choi, 1996; Ryabova et al., 1998). К недостаткам такого способа можно отнести то, что входной поток питающей смеси равен по

объему выходящему потоку низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов, что приводит к быстрой потере проницаемости пор ультрафильтрационной мембраны.

Известно устройство (DE Patent 3914956, Fischer et al., 1990), авторы которого предлагают осуществлять многократный импульсный ввод питающей смеси в реакционный объем. С этой целью осуществляют формирование N циклов по созданию положительного и отрицательного давления в реакционном объеме. В период создания положительного давления ингибирующие продукты синтеза выводятся из реакционного объема через пористый барьер и смешиваются с питающей смесью. В фазе отрицательного давления, часть ингибирующих продуктов синтеза вместе с очередной порцией питающей смеси возвращаются через пористый барьер обратно в реакционный объем. Кроме этого, высокомолекулярные компоненты бесклеточной системы необходимые для длительного синтеза, вместе с продуктами синтеза интенсивно вымываются из реакционной смеси.

Известно устройство (US Patent 5434079, Mozayeny, 1995), в котором повышают эффективность отвода продуктов с большой молекулярной массой путем увеличения площади ультрафильтрационной мембраны. В процессе синтеза компоненты бесклеточной системы удаляются вместе с целевым полипептидом через большую площадь двух параллельных мембран с размером пор от 70 до 100 кД, что в конечном итоге, ограничивает время синтеза.

Наиболее близким, к рассматриваемому в изобретении устройству для синтеза полипептидов в режиме CFCF, является устройство, описанное в патенте US Patent 5478730 (Alakhov et al., 1995), которое содержит один или два пористых барьера. Эти барьеры могут быть выполнены в виде плоских мембран или полых волокон.

В общем случае, приведенные выше примеры описывают способы и устройства, разработанные для поддержания постоянных условий процесса синтеза.

Постоянные условия синтеза обеспечивают посредством вывода низкомолекулярных продуктов синтеза, ингибирующих работу бесклеточной системы, и ввода компонентов поддерживающих синтез. Поддержание условий синтеза осуществлялось выбором одинаковых концентраций солей Mg^{2+} , K^{+} , NTP и других компонентов, как в реакционной смеси, так и в питающей смеси. Авторы, приведенных выше публикаций и патентов, использовали принцип оптимизации при подборе параметров реакционной смеси. Процесс оптимизации требует времени и относится к достаточно дорогостоящим процедурам.

Сущность изобретения

Целью изобретения является разработка способа синтеза целевых полипептидов в эукариотических и прокариотических бесклеточных системах. Изобретение основано на модификации способов синтеза в режимах непрерывного потока (CFCF) или непрерывного обмена (CECF), в которых, наряду с поддержанием процесса синтеза за счет ввода в реакционную смесь компонентов, поддерживающих синтез и вывода из реакционной смеси низкомолекулярных компонентов, ингибирующих синтез, осуществляют непрерывное изменение концентрации некоторых выбранных компонентов, которые определяют эффективность синтеза (например Mg^{2+} , K^{+} , NTP, полиаминов или их комбинаций) в установленном диапазоне изменения концентраций.

Перечень чертежей

Изобретение поясняется чертежами :

На фиг.1 приведены диаграммы, отражающие изменение концентрации Mg^{2+} для двух примеров работы бесклеточной системы при синтезе mRNA и при синтезе полипептидов в режиме непрерывного обмена (CECF).

На фиг.2 приведена диаграмма, отражающая процесс изменения концентрации Mg^{2+} в режиме непрерывного потока (CFCF) при изменении параметров синтеза от преимущественно транскрипционных до преимущественно трансляционных.

На фиг.3 приведена диаграмма изменения концентрации Mg^{2+} при периодическом импульсном вводе дополнительной смеси в объем реакционной смеси.

На фиг.4 приведена диаграмма периодического изменения Mg^{2+} в соответствии с формой линейного градиента.

На фиг.5 представлено схематическое изображение реактора с одним пористым барьером.

На фиг.6 представлено схематическое изображение реакционного модуля и направление потоков, которые формируются в режиме раздельного вывода высокомолекулярной и низкомолекулярной фракций (CFCF-BF).

На фиг.7 представлено схематическое изображение распределения потоков в режиме без вывода целевого продукта из зоны синтеза (CFCF-RP).

На фиг.8 представлено схематическое изображение реакторного модуля и распределение потоков в режиме, когда первый пористый барьер играет роль распределителя потоков питающей смеси и дополнительной смеси и целевой продукт остается в зоне синтеза (CFCF-RP).

На фиг.9 представлено схематическое изображение реакторного модуля и распределение потоков в режиме, когда осуществляется периодическая смена направлений подачи питающей смеси поочередно через первый и второй пористые барьеры (CFCF-RF).

Перечень обозначений используемых в чертежах:

1. F10, F11, F12 - потоки питающей смеси;
2. F20, F21, F22 - потоки дополнительной смеси;

3. F30, F31, F32 - потоки низкомолекулярных продуктов реакционной смеси;
4. F40 - поток высокомолекулярных продуктов реакционной смеси;
5. F50, F51, F52 - потоки высокомолекулярных компонентов, поддерживающих синтез;
6. Позиции 1 - 9 - относятся к входам и выходам реакторного модуля
7. Позиции 10 - 19 - относятся к конструктивным элементам реактора;

Перечень сокращений используемых в тексте:

Mg²⁺ - ион магния добавляемый в виде соли.

K⁺ - ион калия добавляемый в виде соли.

Сущность изобретения

1. Этапы синтеза

Синтез полипептидов в общем случае состоит из следующих шагов:

1. создают реакционную смесь на основе клеточного лизата;
2. готовят питательную смесь и дополнительную смесь, в состав которой входит по крайней мере один из выбранных компонентов, который определяет эффективность синтеза;
3. устанавливают режим работы реактора, выбирают тип реакционного модуля с заданными количеством и типом пористых барьеров, выбирают соотношения объемов между реакционной смесью и питающей смесью или выбирают скорость потока питающей смеси через реакционный объем;
4. собирают установку для синтеза, в состав которой входит, по крайней мере, один реакционный модуль;
5. вводят реакционную смесь и питающую смесь в соответствующие зоны реакционного модуля, разделенные пористыми барьерами;

6. дополнительную смесь вводят в реакционную смесь или в одну из частей питающей смеси до синтеза или во время синтеза;
7. в процессе синтеза, в зависимости от режима работы дополнительную смесь вводят однократно, или периодически, или непрерывно;
8. в режиме препаративного синтеза расходуемые высокомолекулярные компоненты вводят в реакционную смесь однократно, или периодически, или непрерывно;
9. синтезированный продукт отбирают из реакционной смеси в конце синтеза или в ходе синтеза.
10. при отборе продукта в процессе синтеза осуществляют анализ синтезируемого продукта, корректируют параметры, определяющие продуктивность системы.

2. Подготовка реакционных смесей

Бесклеточные системы создаются на основе клеточных лизатов и клеточных экстрактов и включают в себя все компоненты необходимые для синтеза белков, а также систему регенерации NTP, буфер и соли, аминокислоты.

Известно большое число типов бесклеточных систем для синтеза полипептидов (US Patent 5807717, Joyce, 1998). Их готовят из археобактерий (*Halobacterium*, *Thermoproteus*, *Methanococcus*, *Sulfolobus*, etc), эубактерий (*Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, etc) и клеток эукариотов (*rabbit reticulocytes*, *wheat germ*, *HeLa cells*, *mouse liver*, etc.). Условия, описываемые в предлагаемом методе, более близки к трансляционным системам и системам транскрипции-трансляции получаемым на основе прокариотических экстрактов *E. coli* (Zubay, 1973), эукариотических экстрактов из пшеницы (Roberts and Paterson, 1973) и экстрактов приготовленных из ретикулоцитов кролика (Pelham and Jackson, 1976).

Одним из компонентов бесклеточной системы транскрипции-трансляции должна быть DNA зависящая RNA полимераз синтезирующая mRNA. Используемая DNA зависящая RNA полимераз выбирается из класса *E. coli* RNA полимераз или бактериофаговых RNA полимераз. Данное изобретение

рассматривает, но не ограничивает использование полимераз типа T1, T3, T5; T7, SP6, A16, PHL1, PHL11. Наиболее подходящими являются T7 и SP6 полимеразы.

3. Условия проведения синтеза

Известно, что условия проведения синтеза в прокариотических и эукариотических бесклеточных системах различны. Эффективность синтеза зависит от того, входят ли значения концентраций таких компонентов бесклеточной системы как Mg^{2+} , K^+ , NTP в диапазон оптимальных значений и на какую величину эти параметры изменяются в процессе синтеза. Диапазон в которых синтез оптимален, достаточно узок. Любое изменение температуры, pH, изменение исходных концентраций компонентов во время синтеза или другие причины приводят к выходу системы из режима оптимального синтеза и, соответственно, к снижению выхода синтезируемого продукта. Для всех используемых бесклеточных систем оптимизация сводится к тому, что априорным способом устанавливают значения NTP и находят диапазоны концентрации Mg^{2+} и K^+ в которых синтез дает наибольшую производительность.

Это приводит к большому разбросу "оптимальных" концентраций магния, заявленных в разных патентах. Так, для синтеза полипептидов системе транскрипции-трансляции в ретикулоцитном лизате, согласно описания патента фирмы Promega (US 5324637, Thompson et al., 1994) диапазон оптимальных значений концентраций магния в реакционной смеси находится в пределах от 2,5 до 3,5 mM Mg^{2+} . В тоже время, согласно описания другого патента (US 5807717, Joice, 1998) для той же системы транскрипции-трансляции и синтеза полипептидов в ретикулоцитном лизате (произведенного фирмой Promega) заявлен диапазон оптимума лежащий в пределах от 6,0 до 10,0 mM Mg^{2+} .

Известно (Pokrovskaya, 1994), что условия оптимальной транскрипции для SP6, T7, T3 полимераз лежит в пределах от 16 до 36 mM Mg^{2+} . Также известно, что уровень концентрации NTP в значительной степени определяет инициацию

транскрипции (Guajardo et al., 1998), а уровень концентрации Mg^{2+} должен превышать величину суммы концентраций NTP (Gurevich et al., 1991; Kern and Davis, 1997) для эффективной работы полимеразы. В тоже время, диапазон Mg^{2+} для оптимальной трансляции mRNA в бесклеточной системе на основе ретикулоцитного лизата, полученного по стандартной процедуре (Pelham and Jackson, 1976; Suzuki, 1977; Merrick, 1983), лежит в пределах от 1 до 3.0 mM Mg^{2+} добавленного в реакционную смесь сверх того, что содержится в лизате.

Одной из главных целей данного изобретения, является поиск пути разрешения противоречия между выбором оптимальных параметров для этапа транскрипции и этапа трансляции иным способом, чем простой подбор промежуточных значений в концентрациях Mg^{2+} , K^+ и NTP, которые обеспечивают приемлемый уровень как транскрипции, так и трансляции.

В данном изобретении это противоречие разрешается тем, что во время синтеза, наряду с вводом в реакционную смесь компонентов, поддерживающих синтез, и выводом из реакционной смеси низкомолекулярных компонентов, ингибирующих синтез, происходит непрерывное изменение концентрации по крайней мере одного из выбранных компонентов (входящих в следующую группу: Mg^{2+} , K^+ , NTP, полиамины или комбинаций указанных компонентов) от верхней до нижней границы установленного диапазона.

Выбор верхней и нижней границы диапазона зависит от режима синтеза, от параметров бесклеточного экстракта, от параметров реакционной смеси и параметров питающей смеси. Если в состав выбранных компонентов входит Mg^{2+} , то границы области, из которой выбираются все диапазоны изменения концентраций Mg^{2+} для разных режимов (включающих транскрипцию, транскрипцию-трансляцию, трансляцию), лежат в пределах от 0,25 до 50 mM добавленного Mg^{2+} . Если в качестве одного из компонентов бесклеточной системы используют DNA зависимую RNA полимеразу, то в режиме транскрипции mRNA, выбор верхней и

нижней границы конкретного диапазона изменения концентрации Mg^{2+} , осуществляют из области значений от 2 до 50 mM добавленного Mg^{2+} . Если синтез белка производят в условиях транскрипции-трансляции, то выбор верхней и нижней границы конкретного диапазона изменения концентрации Mg^{2+} , осуществляют из области значений от 2 до 25 mM добавленного Mg^{2+} . При синтезе белка в условиях трансляции выбор верхней и нижней границы конкретного диапазона изменения концентрации Mg^{2+} , осуществляют из области значений от 0,25 до 25 mM добавленного Mg^{2+} . Возможны варианты, при которых верхнюю и нижнюю границы диапазона изменений концентрации Mg^{2+} выбирают таким образом, что в процессе синтеза, за счет смены величины концентраций, происходит смена условий синтеза и переход от одного режима (например преимущественной транскрипции) к другому режиму (например режиму транскрипции-трансляции или преимущественной трансляции). Приведенные выше примеры отражают лишь области значений, в которых могут лежать концентрации одного из выбранных компонентов Mg^{2+} , требуемые по условиям синтеза. Ширина выбираемых диапазонов и верхняя и нижняя границы диапазона определяются с учетом знаний относящихся к условиям синтеза в прокариотических и эукариотических бесклеточных системах.

Дополнительной целью данного изобретения является снижение затрат на синтез заданного количества полипептида в эукариотических бесклеточных системах. В известных способах, синтез осуществляют в условиях достаточно большой концентрации дорогостоящей T7 полимеразы, при непрерывном протоке через реакционный объем дорогостоящих компонентов питающей смеси, таких как NTP и аминокислоты (EP Patent 0593757, Baranov et al., 1997). В данном изобретении, эффективность синтеза в системах транскрипции-трансляции повышается за счет того, что введение в реакционную смесь высокой концентрации Mg^{2+} и NTP в начале синтеза приводит к уменьшению количества abortивных

mRNA, что, в свою очередь, приводит к снижению расхода АТФ, ГТФ и аминокислот во время этапа трансляции за счет снижения синтеза abortивных полипептидов.

Приведенные в данном изобретении примеры использования принципа непрерывного потока питающей смеси через реакционный объем (CFCF), ориентированы на снижение затрат при препаративном синтезе целевых полипептидов. Поток питающей смеси и концентрации выбранных компонентов легко регулируются с помощью изменения скорости или направления потока с использованием насоса. Другие технические решения, с использованием режима непрерывного обмена (CECF) и простых диализаторов, также позволяют увеличить эффективность синтеза за счет поддержания концентраций расходуемых низкомолекулярных компонентов и одновременного изменения концентрации выбранных компонентов. Известно, что скорость обмена низкомолекулярными компонентами между реакционной смесью и питающей смесью через диализную мембрану зависит от многих параметров (площадь, размер пор, и др.). Это накладывает некоторые ограничения на выбор режимов синтеза и выбор верхней и нижней границы зоны, в которой изменяют концентрацию выбранных компонентов. Так например, при использовании режима CECF более предпочтительно осуществлять синтез в отдельных режимах: транскрипции, трансляции, транскрипции-трансляции, или в комбинациях двух режимов (например транскрипции и транскрипции-трансляции или транскрипции-трансляции и трансляции). Это вызвано тем обстоятельством, что процесс обмена из-за достаточно низкой скорости, требует времени и может не соответствовать скорости, которая необходима для ввода требуемых для синтеза низкомолекулярных компонентов, и вывода низкомолекулярных продуктов синтеза, ингибирующих работу бесклеточной системы.

На фиг.1 представлены два примера изменения концентрации Mg^{2+} в реакционной смеси для разных режимов синтеза. Первый пример относится к случаю, когда необходимо провести синтез достаточного количества mRNA. Как видно из диаграммы (К), диапазон изменений концентраций выбранных компонентов от верхнего уровня (А) до уровня (С) лежит в пределах в которых в реакционной смеси за счет высокой концентрации Mg^{2+} и NTP создаются условия преимущественной транскрипции и синтеза mRNA. В этой зоне первоначальное превышение концентрации Mg^{2+} над NTP устанавливают при подготовке реакционной смеси в пределах до 10 mM. Дальнейшее снижение концентрации обеспечивает переход системы к значениям концентраций Mg^{2+} и NTP соответствующим параметрам верхней границы зоны транскрипции-трансляции (зона С - D). В качестве второго примера (диаграмма L) выбраны условия, когда верхний предел диапазона концентраций Mg^{2+} и NTP соответствует верхней границе зоны транскрипции-трансляции (зона С - D), а нижний предел диапазона совпадает с нижней границей зоны трансляции (зона D - В). В этом случае, за время синтеза условия в реакционной смеси изменяются от преимущественно транскрипционных до преимущественно трансляционных.. Параметры пористого барьера (размеры пор, площадь мембраны, тип мембраны) и скорость потока питающей смеси вдоль поверхности пористого барьера, должны быть выбраны с учетом скорости диффузии и обмена низкомолекулярных компонентов питающей смеси и реакционной смеси и должны обеспечивать требуемую скорость обмена и изменение концентраций Mg^{2+} и NTP за время синтеза. На выбор верхней и нижней границы диапазона влияет параметры бесклеточного экстракта, который может быть получен разными способами. На свойства реакционной смеси оказывает влияние процентное соотношение в смеси экстракта и питающей смеси. Устанавливая верхний и нижний пределы диапазона, в котором в процессе синтеза изменяют концентраций

выбранных компонентов и регулируют эффективность работы бесклеточной системы в разных режимах.

Режим непрерывного потока (CFCF) позволяет осуществить быструю смену скорости и направление потока питающей смеси через реакционную смесь и, таким образом, регулировать скорость изменения концентраций выбранных компонентов на разных этапах синтеза. В течении одного эксперимента можно выбрать разные скорости потока питающей смеси через реакционную смесь. Это позволяет, в процессе синтеза полипептидов в бесклеточной системе транскрипции-трансляции, независимо регулировать длительность разных этапов, в течении которых параметры реакционной смеси и концентрации выбранных компонентов соответствуют периодам: преимущественной транскрипции, транскрипции-трансляции и трансляции. Выбор конкретных параметров диапазонов, в которых изменяют концентрацию выбранных компонентов, зависит от цели проведения синтеза (синтез mRNA или синтез целевого полипептида или сопряженный синтез в системе транскрипции-трансляции), выбранных условий проведения синтеза и, в первую очередь, от параметров бесклеточного экстракта, выбора параметров пористых барьеров (размеры пор, площади и типы мембран), возможности введения дополнительных расходуемых высокомолекулярных компонентов. Величина верхнего предела всей допустимой области значений концентрации Mg^{2+} (из которой выбирают рабочий диапазон), в режиме (CFCF) для синтеза в системах транскрипции - трансляции с использованием DNA зависимой RNA полимеразы, может быть выбрана в пределах до 50 mM Mg^{2+} . Минимальное значение нижнего значения области концентрации Mg^{2+} может составлять значение 0,25 mM Mg^{2+} .

На фиг. 2, в качестве примера, представлена зависимость (M) изменения концентрации Mg^{2+} от времени для синтеза в системе транскрипции - трансляции. Регулируя скорость потока питающей смеси на первом этапе синтеза (период $t_1 - t_2$) возможно корректировать количество синтезируемых mRNA и предотвратить их

перепроизводство. Высокая концентрация Mg^{2+} и NTP в начале первого периода ($t_1 - t_2$) дает возможность снизить количество дорогостоящей RNA полимеразы за счет того, что синтез mRNA идет с меньшим количеством abortивных mRNA. Соотношение концентраций Mg^{2+} и NTP выбирается таким, чтобы на первом этапе концентрация Mg^{2+} превышала концентрацию NTP на величину от 5 до 10 mM, а на третьем этапе превышение Mg^{2+} над NTP составляло не менее 0,5 mM.

В процессе длительного синтеза в режиме CFCF величины концентраций выбранных компонентов изменяют от верхнего до нижнего уровня однократно или периодически. На фиг 3 приведены диаграмма (N) изменения концентраций Mg^{2+} и NTP при периодическом импульсном вводе дополнительной смеси в объем реакционной смеси. Весь синтез разбивается на N шагов с длительностью шага от t_4 до t_6 . Дополнительная смесь вводится за время $t_4 - t_5$. Концентрации Mg^{2+} и NTP повышаются, проходят уровень C и условия синтеза в реакционной системе входят в зону A-C, в которой происходит преимущественная транскрипция mRNA. Снижение концентраций Mg^{2+} и NTP меняет параметры синтеза от условий транскрипции-трансляции. (зона C-D) до условий преимущественной трансляции (зона D-B).

Препаративный синтез целевых полипептидов часто требует длительного времени, в течении которого в реакционную смесь вводят не только низкомолекулярные компоненты питающей смеси, но и дополнительно вводят высокомолекулярные компоненты поддерживающие длительный синтез. В группу высокомолекулярных компонентов входят: (i) рибосомная фракция, (ii) бесклеточный экстракт (S30, S100 и их модификации), (iii) полимеразы, (iv) плазмиды, (v) tRNA. В зависимости от условий синтеза высокомолекулярные компоненты вводят в реакционный объем однократно, или непрерывно, или периодически. Такие компоненты как полимеразы и плазмиды предпочтительно вводить в реакционную смесь одновременно с вводом максимальной концентрации Mg^{2+} и NTP на этапе

транскрипции. Ввод рибосомной фракции предпочтительно синхронизировать с периодом трансляции.

На фиг. 4 приведены диаграмма (О) изменения концентраций Mg^{2+} и NTP при формировании в течении синтеза линейного градиента концентраций этих компонентов. Примеры формирования линейных градиентов широко известны и используются, например, в жидкостной хроматографии. Предпочтительно использовать данный режим для проведения препаративного синтеза целевого полипептида в системе трансляции mRNA. В этом режиме значения концентраций Mg^{2+} и NTP, входящих в общий диапазон изменения концентраций (E-F), должны быть соотнесены с диапазоном, в котором значения концентраций Mg^{2+} и NTP наиболее близко расположены к оптимуму трансляции mRNA. Диапазон допустимых значений концентраций Mg^{2+} и NTP может быть определен для известных типов экстрактов из литературных источников или из технических описаний прилагаемых фирмами. Некоторое снижение эффективности трансляции в зонах, прилегающих к границам диапазона (E-F), компенсируется многократным проходом условий синтеза через зону оптимума при периодическом изменении концентраций Mg^{2+} и NTP в соответствии с формой линейного градиента. Как и в ранее рассмотренном случае, весь синтез разбивается на N шагов с длительностью шага от t_7 до t_9 . На первом промежутке времени $t_7 - t_8$ дополнительная смесь, содержащая высокий уровень концентраций Mg^{2+} и NTP смешивается с питающей смесью таким образом, что концентрация Mg^{2+} и NTP в суммарной смеси растет. Суммарная смесь вводится в реакционную смесь и изменяет условия синтеза. Одновременно с этим она поддерживает синтез и выводит из реакционного объема низкомолекулярные компоненты ингибирующие синтез. При изменении соотношений смешиваемых объемов и уменьшении ввода дополнительной смеси по отношению к питающей смеси происходит снижение уровня концентраций Mg^{2+} и NTP в суммарной смеси. Концентрации Mg^{2+} и NTP в реакционной системе

снижаются и проходят через участок зоны (E-F) в которой происходит максимальный синтез. Ввод в реакционный объем дополнительных высокомолекулярных компонентов поддерживающих синтез осуществляют в зависимости от условий синтеза непрерывно или периодически.

Аналогичным способом можно осуществлять управление и процессом препаративной транскрипции для наработки достаточного количества mRNA. Отличия от известных технических решений для синтеза mRNA в статическом (batch) режиме и способов, в которых осуществляют подпитку (fed batch) статических систем транскрипции без вывода низкомолекулярных продуктов (Kern and Davis, 1997) состоят в том, что: а) за счет вывода низкомолекулярных компонентов, ингибирующих синтез mRNA, продляется процесс синтеза и увеличивается выход mRNA; б) за счет выбора нижней границы диапазона, в котором находятся концентраций Mg^{2+} и NTP, можно получать препараты mRNA в условиях, способствующих дальнейшему этапу трансляции синтезируемой mRNA без дополнительных процедур очистки; в) использование высоких концентраций Mg^{2+} (например, до 50 mM) приводит к снижению выхода abortивных или неполных молекул mRNA и позволяет снизить количество дорогостоящей RNA полимеразы.

4. Реакторный модуль

Обеспечить рассмотренные режимы работы можно путем соответствующего выбора варианта конструкции реакционного модуля. Внутри реакционного модуля с помощью пористых барьеров создают реакционный объем, зоны для ввода компонентов питающей смеси, дополнительной смеси, высокомолекулярных компонентов поддерживающих синтез и вывода продуктов, ингибирующих синтез, и продуктов синтеза.

В простейшем случае объем реакционного модуля разделяется на две зоны: (а) в режиме CECF, объем разделяется одним пористым барьером на зону с реакционной смесью и зону с питающей средой; (б) в режиме CFCF, объем

разделяется пористым барьером на зону с реакционной смесью, в которую вводят питающую смесь, и зону отбора продуктов синтеза (US Patent 5478730, Alakhov et al., 1995).

Известны реакторы, в которых формируют три зоны (US Patent 5135853 Dzewulski et al., 1992; US Patent 5478730, Alakhov et al., 1995, DE Patent Appl. 19832160.0 A1, Bauer et al., 1999): зону ввода питающей смеси, зону с реакционной смесью и зону вывода продуктов синтеза. Такое размещение зон вызывалось необходимостью поддержания постоянных условий синтеза. В данном изобретении, эффективность синтеза должна обеспечиваться с одной стороны за счет поддержания в реакционной смеси постоянного состава аминокислот и ряда других компонентов и активного (в режиме CFCF) или пассивного (в режиме CECF) регулирования величины концентраций выбранных компонентов. Это условие в значительной степени определяет выбор конструкции реакторов, предназначенных для разных режимов. Наибольшее количество применений обеспечивает конструкция реактора с двумя пористыми барьерами которые формируют три зоны в объеме реактора. Количество зон может быть большим в зависимости от конструктивных особенностей реакторного модуля.

Величина объема реакционной смеси зависит от условий и цели проведения синтеза. Известно (US Patent 5324637, Thompson et al., 1994), что для исследовательских целей синтез осуществляют в микрообъемах. Синтез в препаративном масштабе (EP Patent 0593757, Baranov et al., 1997) производят реакторах с объемом от 1,0 мл. Для осуществления синтеза в исследовательских целях минимальный реакционный объем выбирают в пределах от 50 до 500 мкл. Синтез в препаративном количестве ведут в одном или нескольких реакционных модулях с объемом от 500 мкл. до 10мл. Количество реакционных объемов, входящих в реактор, может лежать в диапазоне от 1 до 10 в зависимости от использования типов реакторных модулей.

В каждой точке реакционного объема должно одновременно осуществляться три процесса: а) ввод питающей среды; б) отвод низкомолекулярных продуктов ингибирующих процесс синтеза; в) формирование временного изменения концентраций выбранных компонентов, определяющих эффективность процесса синтеза. Предпочтительной является конструкция модуля реактора, в которой осуществляют формирование тонких слоев реакционной смеси любой формы. Толщину слоя выбирают из условия, что непрерывный обмен компонентов реакционной смеси и питающей смеси или поток питающей смеси через реакционную смесь также как и удаление низкомолекулярных продуктов ингибирующих синтез должно происходить за время в течение которого синтез не снижается ниже допустимого уровня. Реакционная смесь может быть помещена в объем любой формы, который формируется между поверхностями пористых барьеров. При использовании полых волокон, плоских мембран или их комбинаций, форма реакционного объема может быть или цилиндрической или выполнена в виде плоского слоя с толщиной от 0,1 до 5мм. Внутренние объемы реакционной смеси и питающей смеси могут перемешиваться или за счет создания циркуляции реакционной смеси по замкнутой петле с использованием насоса (US Patent 5434079, Mozayeni, 1995), или за счет встряхивания реактора (US Patent 5593856, Choi, 1997), или с помощью магнитной мешалки (Kim and Choi, 1996). Объем реакционной смеси может предварительно заполняться различного рода сепараторами или наполнителями органического и неорганического происхождения. В качестве таковых могут быть использованы пористые, слоистые, капиллярные материалы выбираемые из группы: а) фильтров из синтетических полимерных или неорганических материалов, б) пористых металлов или их композиции, в) гелеобразных структур. Введение пористых материалов с размерами пор от 10мкм. до 0,1мм., в реакционную смесь позволяет увеличить площадь на которой происходит соударение молекул, что в конечном итоге ведет к возрастанию скорости

реакций связанных с синтезом (Alberts et al., 1983). В группу материалов кроме полимерных материалов, неорганических оксидов, цеолитов (US Patent 5593856, Choi, 1997) могут входить сорбенты используемые для хроматографии, в том числе и аффинные (Maier et al., 1998), с помощью которых можно выделить из реакционной системы целевой синтезируемый полипептид. Использование пористых материалов любого типа ограничивается лишь их химической активностью и возможностью ингибирования синтеза.

Пористые барьеры, такие как мембраны, полые волокна и другие пористые структуры должны обеспечивать обмен компонентов между питающей смесью и реакционной смесью или играть роль распределителей потоков питающей смеси через реакционный объем. Нет ограничений связанных с одновременным использованием в реакторе пористых барьеров разных типов (мембраны, полые волокна) и разных типов материалов (твердых или твердых в комбинации с гелеобразными структурами). Пористые барьеры могут быть использованы в виде однослойных или многослойных конструкций, включая использование разных материалов.

Приведенные в описании конструктивные варианты, связанные с размещением пористых барьеров друг относительно друга, могут быть модифицированы в другие варианты на основе известных знаний.

Примеры осуществления изобретения

Ниже приводятся примеры вариантов формирования потоков (питающей смеси, дополнительной смеси или их комбинаций) в реакторных модулях для осуществления эффективного синтеза в режиме непрерывного обмена (CECF) или режиме непрерывного потока (CFCF).

Пример 1.

На фиг. 5 представлено схематическое изображение реактора 10 с одним пористым барьером 11, который разделяет общий объем реакционного модуля на две части. В одной части объема 14, ограниченной поверхностью пористого барьера 11, размещают реакцию смесь, которую вводят через вход 1. Во вторую часть объема 15 через вход 2 вводят питающую смесь, которая соприкасается с поверхностью пористого барьера 11. Пористый барьер может иметь плоскую или цилиндрическую формы. В первом случае используют диализные или ультрафильтрационные мембраны, выполненные в виде диска, квадрата или прямоугольника. Во втором случае используют полые волокна или диализные мешки. Инкубацию реакционной смеси проводят при температуре лежащей в диапазоне от 20 до 40 °C. Температурный диапазон предпочтительный для экстракта пшеницы лежит в диапазоне от 20 до 26°C, для ретикулоцитного лизата используют диапазон от 28 до 38°C, при работе с экстрактом E-coli выбирают температурный диапазон в пределах от 20 до 38°C. Для повышения эффективности обмена между питающей смесью и реакционной смесью, создают тангенциальные потоки вдоль внутренней и внешней поверхности мембраны. Для режима CECF параметры пористого барьера выбирают из условий вывода из реакционного объема только низкомолекулярных компонентов (размеры пор лежат в диапазоне до 30kD), или одновременно низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов (размеры пор выбирают в пределах от 30 до 100kD). Входы 1 и 2 в реакторный модуль могут быть герметично закрыты в процессе синтеза или открыты и в двух частях реакционного объема автоматически поддерживается одинаковое давление. Это позволяет в процессе синтеза вводить в реакционную смесь или в питающую смесь субстраты поддерживающие синтез или дополнительно изменять концентрацию выбранных компонентов независимо от процесса диффузии. Перед началом синтеза выбирают соотношение объемов реакционной смеси и питающей

смеси в пределах от $1/5$ до $1/100$ и соответственно выбирают соответствующий тип реакционного модуля по характеристикам объема, размера пор и площади диализной мембраны.

Ниже приводятся примеры использования предлагаемого способа синтеза в режиме непрерывного потока (CFCF)

Синтез полипептидов в аналитических целях проводится в микрореакторах с реакционным объемом от 50 мкл. Синтез полипептидов в препаративных количествах накладывает свои условия на способ синтеза и конструкцию реактора. Ниже рассматриваются варианты, которые могут быть выполнены с помощью одноканальных и многоканальных реакторов, в том числе и с разделением потоков внутри реакционного объема. Варианты пористых барьеров, их параметры, толщина слоя реакционной смеси во многом аналогичны рассмотренным ранее вариантам.

Конструкции реакторов, используемые в проточном режиме, должны позволять обеспечивать ввод в реакционный объем не только питающей смеси, в которую входят низкомолекулярные компоненты, но и ввод высокомолекулярных компонентов, непосредственно в реакционный объем или через пористый барьер. Последний выполняет функцию распределителя потока и имеет размер пор до 5000 kD, через которые свободно проникает большинство компонентов, входящих в S30 экстракт исключая рибосомы и образованные вокруг нее комплексы. Число возможных конструкций реакторов, которые можно разработать на основе известных знаний достаточно велико и приведенные ниже примеры не ограничивают область применения других вариантов.

Пример 2

Синтез, в режиме непрерывного ввода питающей смеси с разделением выходных потоков на фракции содержащие высокомолекулярные и низкомолекулярные компоненты синтеза (CFCF-BF), позволяет концентрировать синтезируемый полипептид внутри реакционной смеси за счет независимого

регулирования выходных потоков. На фиг. 6 представлено схематическое изображение реакционного модуля и направление потоков, которые формируются в режиме раздельного вывода высокомолекулярной F40 и низкомолекулярной F30 фракций. Реакционный модуль имеет корпус 10 два пористых барьера 11и 12, которые формируют реакционный объем 14, расположенный между внутренними поверхностями пористых барьеров и две зоны 15 и 16 для ввода/вывода жидкостных коммуникаций, которые контактируют с внешней поверхностью пористых барьеров. Подготовленная реакционная смесь вводится в реакционный объем через вход 1. На этот же вход в процессе синтеза подают: (а) питающую смесь F10; (б) дополнительную смесь F20; (в) фракцию высокомолекулярных компонентов F50. Подачу питающей смеси на вход 1 осуществляют непрерывно или периодически. Дополнительную смесь F20 и фракцию высокомолекулярных компонентов F50 подают в реакционную смесь в зависимости от условий синтеза однократно, периодически или непрерывно. Фракцию высокомолекулярных компонентов F50 вводят в реакционный объем независимо от питающей смеси F10, или высокомолекулярные компоненты предварительно смешивают с питающей смесью. Синтез может быть осуществлен без ввода фракции F50. Перед началом синтеза выбирают соотношения между объемами вводимых по условиям эксперимента фракций питающей смеси, дополнительной смеси и высокомолекулярной фракции по отношению к объему реакционной смеси и скорости потока этих фракций через реакционный объем. Размер пор первого пористого барьера 11 выбирают исходя из молекулярного веса и размеров целевого полипептида в пределах от 30 до 100 kD, размер пор второго пористого барьера 12 выбирают в пределах до 30 kD. В зависимости от выбранного режима синтеза выбирают соотношение объемов проходящих через первый и второй пористые барьеры в пределах от 1/1 до 1/100.

Пример 3

На фиг. 7 приведено схематическое изображение потоков в реакторе в котором первый и второй пористые барьеры имеют одинаковый или разный размер пор лежащий в пределах до 30 kD. В этом случае синтез происходит без вывода высокомолекулярной фракции F40 и целевого продукта из зоны синтеза (CFCF-RP), а потоки F31 и F32 содержат только низкомолекулярные компоненты синтеза. Данный режим используют в тех случаях, когда синтезируемый полипептид превышает величину 80-100 kD или когда накопление синтезируемого полипептида в реакционном объеме не ингибирует процесс синтеза. Режимы ввода питающей смеси, дополнительной смеси, и фракции с высокомолекулярными компонентами аналогичны режиму CFCF-BF.

Пример 4

Пористые барьеры можно использовать как распределители потоков питающей смеси и дополнительной смеси в тех случаях, когда объем, в который вводится реакционная смесь, заполнен пористыми структурами и перемешивание реакционного объема затруднено или не возможно.

На фиг. 8 приведена структурная схема реакторного модуля и направление потоков в режиме CFCF-RP, в котором первый пористый барьер играет роль распределителя потока питающей смеси F10 и дополнительной смеси F20. Размеры пор первого пористого барьера 11 выбираются в пределах до 5000 kD. Это позволяет вводить через первый пористый барьер часть фракции высокомолекулярных компонентов F51, если размеры компонентов включенных во фракцию F51 меньше размеров пор первого барьера. К таким компонентам относятся tRNA, ферменты и др. При необходимости рибосомную фракцию F52 вводят в реакционный объем 14 непосредственно через жидкостной вход 1. Параметры второго пористого барьера выбираются в пределах до 30 kD. Поток низкомолекулярных компонентов синтеза F30 ингибирующих работу системы выводится через выход 5.

Пример 5

На фиг. 9 приведено схематическое изображение потоков для режима CF-CF-RF в котором осуществляется периодическая смена направлений подачи питающей среды через первый и второй пористые барьеры. В этом режиме, предназначенном для длительного синтеза полипептидов, переключение направлений подачи питающей смеси позволяет очищать поры первого 11 и второго 12 пористых барьеров. Синтез проводят или без вывода высокомолекулярных продуктов из объема реактора (размер пор первого и второго барьеров выбирается одинаковым и лежит в диапазоне до 30 kD), или в режиме с отбором части синтезируемого продукта из реакционного объема (размер пор первого пористого барьера выбирают до 100kD, а размер второго пористого барьера до 30kD). Поток высокомолекулярных компонентов F50 вводится через вход 1 в реакционный объем. В процессе синтеза формируют N шагов ввода питающей смеси и дополнительной смеси. Каждый шаг разбивают на два периода. В течении первого периода с помощью жидкостных кранов резервуары с питающей смесью и дополнительной смесью подключают к входу 2. Потоки питающей смеси F11 и поток дополнительной смеси F21 вводят в зону 16, которая сформирована поверхностью первого пористого барьера 11. Через поры первого пористого барьера питающая и дополнительная смеси вводятся в зону синтеза 14 реактора и через поры второго пористого барьера 12 из зоны синтеза низкомолекулярные компоненты синтеза выводятся в зону 15 и далее формируют поток 32 который выводят за пределы реактора через выход 5. После окончания первого периода краны переключаются и подключают резервуары с питающей смесью и дополнительной смесью ко входу 3, который сопряжен с зоной 15, которая сформирована вторым пористым барьером 12. Потоки F12, F22 через поры второго пористого барьера проникают в реакционную смесь и одновременно очищают поры второго барьера, которые закрылись на первом шаге синтеза. Низкомолекулярные компоненты выводятся из реакционного объема через поры

первого пористого барьера и формируют поток F31 который выводится из реактора через выход 4. Регулируя длительности первого и второго периодов ввода потоков питающей и дополнительной смеси в реакционный объем через первый или второй пористые барьеры изменяют объемное соотношение потоков F31 и F32.

Промышленная применимость

Изобретение можно использовать в исследовательской и прикладной практике для синтеза полипептидов в бесклеточной системе на основе экстрактов эукариотических и прокариотических клеток. Описанный способ позволяет исследователю оптимизировать не только весь процесс синтеза в целом, но исследовать вклад отдельных компонентов в поддержание синтеза на отдельных этапах транскрипции, транскрипции-трансляции и трансляции.

Литература:

- Alakhov J. B. et al. Method of preparing polypeptides in a cell -free translation system. US Patent 5478730 , US Cl. 435/68.1 (26.12.1995)
- Alakhov J.B. et al. Method of obtaining polypeptides in cell-free translation system. EP Pateñt 0312617, Int. Cl. C12P 21/00 (03.03.1993)
- Alberts B. et al. Molecular biology of the cell. New York, London, p.133 (1983)
- Baranov V.I. et al. Gene expression in a cell-free system on the preparative scale. Gene 84:463-466 (1989)
- Baranov V.I. et al. Method for obtaining polypeptides in a cell-free system. EP Patent 0593757, Int. Cl. C12P 21/00 (15.01.1997)
- Baranov V.I. et al. Method for preparative expression of genes in a cell-free system of conjugated transcription/translation. EP Patent 0401369, Int. Cl. C12P 21/00 (31.05.1995)
- Baranov V.I., Spirin A.S. Gene expression in cell-free system on preparative scale. From: "Methods in Enzym." Vol. 217 "Recombinant DNA", Part H, Edit. R. Wu, Academic Press p.p. 123-142 (1993)
- Bauer H. et al. Verfahren und forrichtung zur Durchführung biochemischer Reactionen. DE Patent Applic. 19832160.0 A1, Int. Cl. C12M 1/12 (04.02.1999)
- Beckler G.S. Coupled transcription and translation in eukaryotic Cell-free extract. US Patent 5324637, U.S.Cl. 435/68.1 (09.09.1997)
- Choi C. et al. Method producing protein in a cell-free system. US Patent 5593856 , US Cl. 435/68.1 (14.01. 1997)
- Clark C. Dialysis device with hermetically sealed vacant chamber. US Patent 5503741 , US Cl. 210/232 (02.04.1996)
- Craig D. et al. Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system, Nucl. Acids Res. V. 20, No. 19: 4987-4995 (1993)

- Davis J. et al. Large scale dialysis reactions using E. Coli S30 extract systems Promega Notes N 56: 14-20 (1996)
- Dziewulski D. et al. Three compartment bioreactor and method of use. US Patent 5135853, US Cl. 435/04 (04.04.1992)
- Erdmann V.A. et al., The Protein - Bioreactor: Its Potentials for the Synthesis of Proteins in Biotechnology, Medicine and Molecular Biology. First German - russian Summerschool on In vitro Systems, 64-70, Berlin (1994)
- Fischer K., Bauer H. Verfahren zur Beschleunigung des Stoffaustauschs eines kontinuierlichen Bioreaktors und Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens, DE Patent Appl. 3914956 A1, IPC Cl. C12M 1/12 (22.11.1990)
- Flaherty J.E. Disposable dialysis apparatus. US Patent 5324428 , US Cl. 210/232 (28.06. 1994)
- Guajardo R. et al. NTP Concentration Effects on Initial Transcription by T7 RNAP Indicate that Translocation Occurs through Passive Sliding and Reveal that Divergent Promoters have Distinct NTP Concentration Requirements for Productive Initiation. J. Mol. Biol. 281, 777 - 792 (1998)
- Gurevich V. et al. Preparative *in - Vitro* mRNA Synthesis Using SP6 and T7 RNA Polymerases. Analyt. Biochem. 195: 207-213 (1991)
- Joice G.F. Coupled isothermal polynucleotide amplification and translation system. US Patent 5807717 , U.S. Cl 435/091.1 (15.09.1998)
- Kern J.A., Davis R.H. Application of solution equilibrium analysis to in-vitro RNA transcription. Biotechnol. Prog., 13: 747-756 (1997)
- Kim D.M., Choi C.Y. A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. Biotechnol. Prog., Sep., 12: 645 - 649 (1996)
- Laios E. et al. Novel hybridization assay configurations based on in vitro expression of DNA reporter molecules. Clin. Biochem, Apr, 31: 3, 151-158 (1998)

- Maier T. et al. Strep-tag II affinity purification: an approach to study intermediates of metalloenzyme biosynthesis. *Anal. Biochem.* 259:1, 68-73 (1998)
- Merrick W. C. Translation of Exogenous mRNAs in Reticulocyte Lysates. From: "Methods in Enzymology" Vol.101:"Monitoring cloned gene expression" Academic Press, Inc. p.p.606-615 (1983)
- Mozayeni B.R. Apparatus and process for continuous in vitro synthesis of proteins. US Patent 5434079, US Cl. 435/311 (07.18.1995)
- Operating Guide, Linked in vitro SP6/T7 Transcription/Translation Kit. Roche Diagnostics GmbH (1998)
- Operating Guide, Single Tube Protein™ System 3. Novagen Inc. (1998)
- Ovodov S.J. et al. Method for obtaining polypeptides in a cell-free translation system. EP Patent 0485608, Int. Cl. C12P 21/00 (22.11.1995)
- Palmenberg A.C. et al. Translation enhancer. US Patent 4937190, US Cl. 435/69.1 (26.06.1990)
- Pelham H.R.B., Jackson R.J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* V. 67: 247-256 (1976)
- Pokrovskaya I., Gurevich V. *In - vitro* Transcription: Preparative RNA Yields in Analytical Scale Reactions. *Analyt. Biochem.* 220: 420-423 (1994)
- Roberts B. E. Protein translation method. US Patent 4668624, US Cl. 435/68 (28.03.1979)
- Roberts B.E., Paterson B.M. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 8S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 2330-2334 (1973)
- Ryabova L. A. et al. Continuous-flow cell-free translation, transcription-translation, and replication-translation systems. From: "Methods in Molecular Biology" Vol.77 "Protein Synthesis: Methods and Protocols". Edit. R. Martin, Humana Press Inc. Totowa, NJ p.p. 179-193 (1998)

- Ryabova L. A. et al. Preparative synthesis of globin in a continuous cell-free translation system from rabbit reticulocytes. *Nucleic Acids Res.* 17, 11: 4412 (1989)
- Sakurai T. Method for production protein in cell-free system and device therefor. JP Patent 7031494, IPC Cl. C12P 21/00 (03.02.1995)
- Sato T. Method for synthesizing polypeptide. JP Patent 5076381, IPC Cl. C12P 21/00 (30.03.1995)
- Shimizu N. Metod for synthesizing protein by extracted solution of cell and device therefor. JP Patent 7075592, IPC Cl. C12P 21/00 (20.03.1995)
- Spirin A.S. Cell-Free Protein Synthesis Bioreactor. From: "Frontiers in Bioprocessing II", Edit. Todd P. et al, Amer. Chemic. Soc. p.p. 31 - 43 (1992)
- Spirin A.S. et al. A Continuous Cell-Free Translation System Capable of Producing Polypeptides in High Yeld. *Science*, 242: 1162-1164 (1988)
- Suzuki H. Effect of Concentration of KCL, Magnesium Acetate and Spermine on the Ratio of α to β Globin Chains Synthesized. *J. Biochem*, 82:1, 251-260 (1977)
- Takanori K. et al. A Continuous Cell-Free Protein Synthesis System for Coupled Transcription-Translation. *J. Biochem.* 110: 166-168 (1991)
- Thompson D.V. et al. Coupled transcription and translation in eukaryotic Cell-free extract. US Patent 5324637, US Cl. 435/68.1 (28.06.1994)
- Volyanik E.V. et al. Synthesis of Preparative Amounts of Biologically Active Interleukin 6 Using a Continuous-Flow Cell-Free Translation System. *Analyt.Biochem.* 214: 289-294 (1993)
- Wimmer E, et al. De novo cell-free synthesis of picornavirus. US Patent 5674729, US Cl. 435/235.1 (07.10.1997)
- Yamamoto Y., et al. Hollow fiber reactor for continuous flow cell-free protein production. *J. Chem.Eng. Japan*, 6:1047-1050 (1996)
- Yamane T. et al. Synthesis of protein by cell-free protein synthetic system and apparatus therefor. JP Patent 10080295, IPC Cl. C12P 21/00 (31.03.1998)

Zubay G. In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu. Rev. Genet.* 7: 267-287
(1973)

ФОРМУЛА

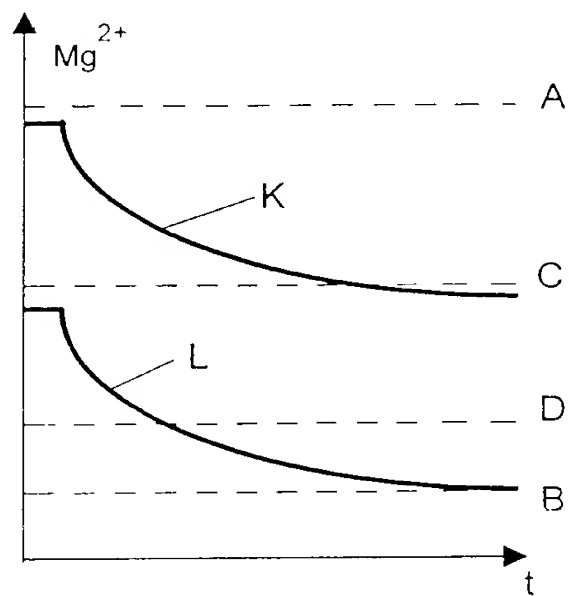
1. Метод синтеза полипептидов в бесклеточной системе, по которому готовят реакцию смесь, используя клеточный лизат или экстракт, выбирают режим синтеза и область значений, в которой устанавливают параметры бесклеточной системы и параметры процесса синтеза, определяют способ обмена компонентами между реакционной смесью и питающей смесью, выбирают тип и параметры, по крайней мере одного, пористого барьера, вводят реакционную смесь и питающую смесь в реакционный модуль и проводят синтез, отличающееся тем, что на этапе выбора параметров процесса определяют типы выбранных компонентов, которые влияют на эффективность синтеза, определяют верхнюю и нижнюю границы диапазона, в котором в процессе синтеза изменяют значения концентраций выбранных компонентов, формируют дополнительную смесь, в состав которой входят выбранные компоненты, вводят дополнительную смесь в реакционную смесь или в питающую смесь, проводят синтез в условиях, когда концентрации выбранных компонентов изменяют в выбранном диапазоне, а концентрации других компонентов поддерживают постоянными.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что по крайней мере один из выбранных компонентов входит в состав группы, состоящей из Mg^{2+} , K^{+} , NTP, polyamine или их комбинаций.

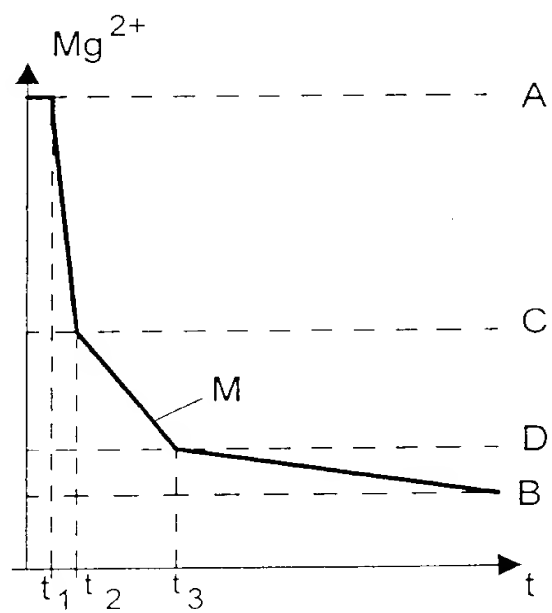
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что в состав одной из комбинаций выбранных компонентов входят Mg^{2+} и NTP.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что способ синтеза выбирают по крайней мере из одного режима, выбираемого из группы включающей: трансляцию, сопряженную транскрипцию - трансляцию, транскрипцию - трансляцию проводимых в одном объеме, транскрипцию или из комбинаций этих режимов.

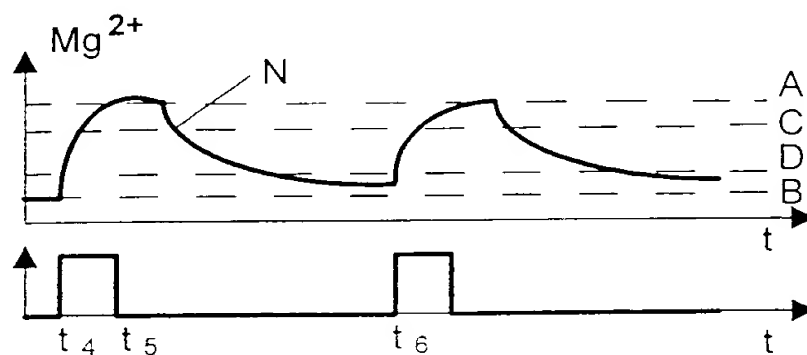
5. Способ по п.4, отличающийся тем, что, в зависимости от режима синтеза, NTP, которые включены в состав дополнительной смеси, состоят из группы АТР, GTP, UTP, CTP или АТР, GTP.
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительную смесь вводят в реакционную смесь до синтеза или во время синтеза, или дополнительную смесь вводят в часть питающей смеси до синтеза или во время синтеза.
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что ввод дополнительной смеси во время синтеза осуществляют однократно, периодически или непрерывно.
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что ввод низкомолекулярных компонентов питающей смеси в реакционную смесь выбирают из группы режимов непрерывного обмена или группы режимов непрерывного потока или комбинаций этих режимов.
9. Способ по п.1, отличающийся тем, что реакционную смесь приготавливают на основе бесклеточной системы которую приготавливают из клеток прокариотов или из клеток эукариотов или их комбинаций.



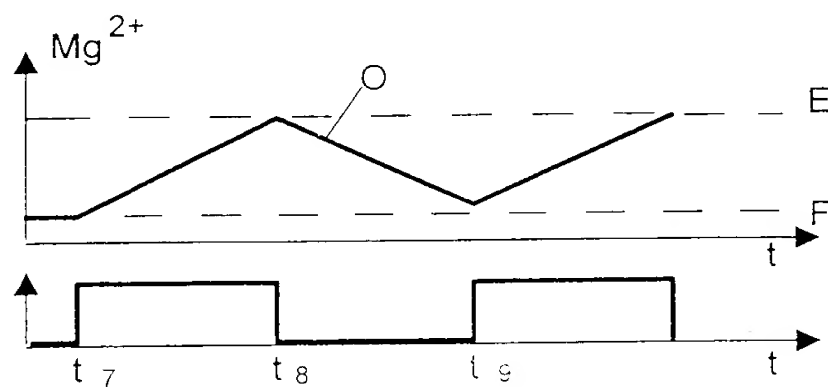
Фиг. 1



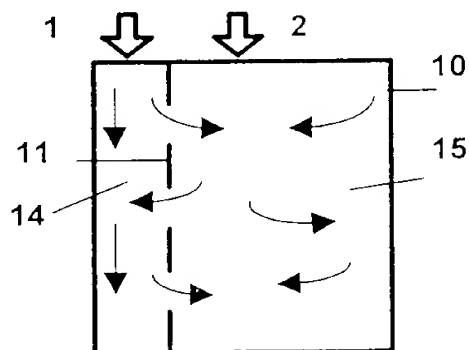
Фиг. 2



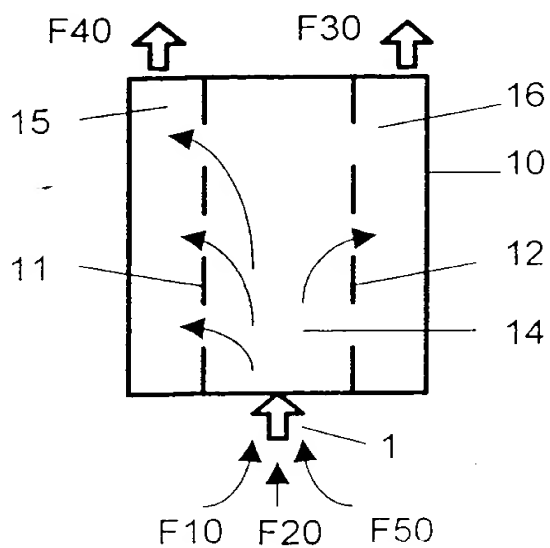
Фиг. 3



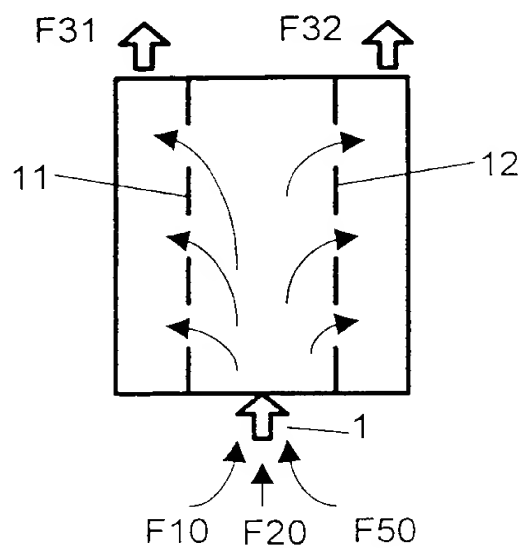
Фиг. 4



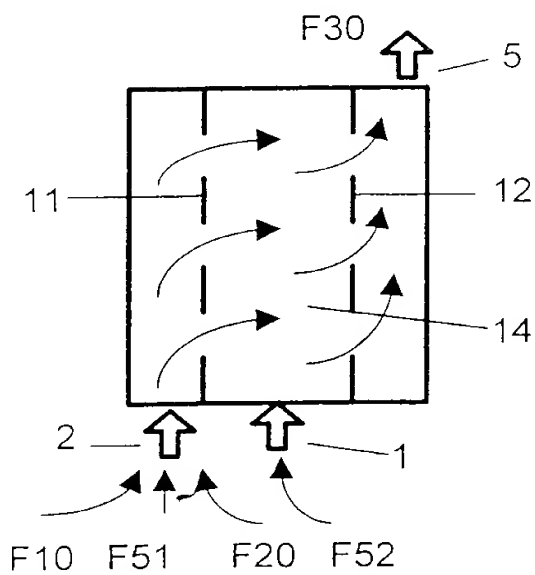
Фиг. 5



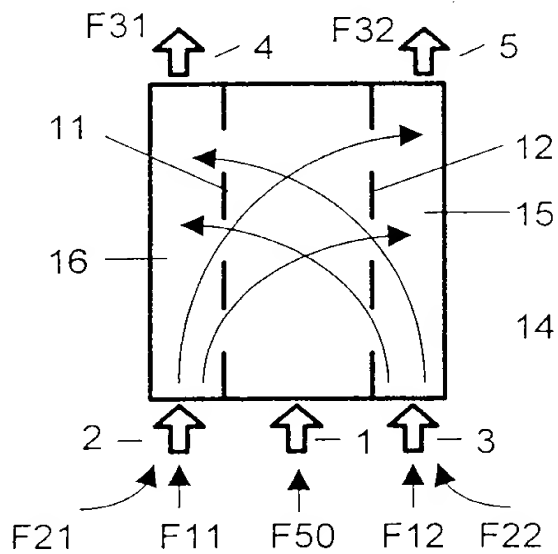
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

РЕФЕРАТ

Способ синтеза полипептидов в эукариотических и прокариотических бесклеточных системах основан на модификации способов синтеза в режимах непрерывного потока или непрерывного обмена, в которых, наряду с поддержанием процесса синтеза за счет ввода в реакционную смесь компонентов, поддерживающих синтез и вывода из реакционной смеси низкомолекулярных компонентов, ингибирующих синтез, осуществляют непрерывное изменение концентрации, одного или нескольких компонентов, которых выбирают из группы Mg^{2+} , K^{+} , NTP, полиаминов или их комбинаций и которые определяют эффективность синтеза в заданном диапазоне изменения концентраций.